

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 739 988 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
30.10.1996 Patentblatt 1996/44

(51) Int. Cl.⁶: **C12Q 1/68**, **C12P 19/34**,
C07H 21/04

(21) Anmeldenummer: **96106728.7**

(22) Anmeldetag: **29.04.1996**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IE IT LI NL SE

(30) Priorität: **29.04.1995 DE 19515891**

(71) Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**
68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder:

- **Heldrich, Björn**
10783 Berlin (DE)
- **Robinson, Peter-Nicholas, Dr.**
10629 Berlin (DE)
- **Tiecke, Frank**
13057 Berlin (DE)
- **Rolfs, Arndt, Dr.**
10999 Berlin (DE)

(54) **Verfahren zur Gattungs- und speziespezifische Identifizierung von Legionellen**

(57) Verfahren zur gattungsspezifischen Amplifikation von Legionellen und gattungsspezifische oder speziespezifische Identifizierung.

EP 0 739 988 A1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella* und Verfahren zum gattungs- und speziesspezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* sowie dafür geeigneter Reagenzien.

Legionellen sind aquatische, ubiquitäre gramnegative aerobe, fakultativ intrazelluläre stäbchenförmige Bakterien. Die Familie Legionellaceae besteht aus einer Gattung (*Legionella*) mit derzeit 48 bekannten Spezies und 51 Serogruppen. Von der wichtigsten Spezies *L. pneumophila* existieren 16 bekannte Serovaren. Unter ihren wichtigsten Reservoiren sind Wasserleitungen, Klimaanlage und Kühltürme. Die Infektion des Menschen erfolgt über legionellenhaltige Aerosole. Die Legionellose tritt häufig als Epidemie, z. B. über Duschköpfe aus Warmwasseranlagen, kontaminiertes Kühlwasser in Klimaanlage, oder sporadisch auf Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bisher nicht beschrieben.

Legionellen-Infektionen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die Legionärskrankheit, eine akute, schwere, oft mit hohem Fieber, abdominellen Beschwerden, Kopfschmerzen, Myalgien und Verwirrheitszuständen und anderen neurologischen Symptomen einhergehende atypische Pneumonie sowie das Pontiac-Fieber, eine mit grippähnlichen Symptomen verlaufende selbstlimitierende Variante der Legionellose.

Die wichtigste Serogruppe von *L. pneumophila*, ist *L. pneumophila* Serogruppe 1 (*L. pn. Ser. 1*) als dem mit ca. 80 % häufigsten Erreger der Legionärskrankheit. Es existieren aber große regionale Unterschiede, insbesondere bei den nosokomial erworbenen Legionellen. Im Gegensatz dazu werden bei Pontiac-Fieber überwiegend *L. micdadei* und andere Non-*Pneumophila*-Spezies als kausales Agens beschrieben.

Die Labordiagnostik der Legionellen ist schwierig. Legionellen können nur schlecht mit Fuchsin angefärbt werden, so daß man die Erreger mit der Gram-Färbung praktisch nicht darstellen kann. Legionellen wachsen nicht auf üblichen Kulturmedien, sondern nur auf Spezialnährböden und einer Atmosphäre, die 2,5 - 5 % CO₂ enthält. Die Sensitivität der Kultur ist nur ca. 20 % für *L. pneumophila* und ca. 5 % für andere Spezies.

Zum Nachweis von Legionellen wurden unter anderem DNS-DNS-Hybridisierungen, Pulsfeld-Elektrophorese, Ribotyping, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, Fettsäure- und Ubichinon-Analysen, rRNS-Sequenzierung, RT-PCR und Southern Blot, Latex-Agglutination, Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie, indirekte Immunfluoreszenz und Kohlenhydratutilisation (BIOLOG-System) angewandt.

In Med. Microbiol. Lett. 1994; 3: 279-290 und Clin. Lab. 1994; 40: 211-216 ist die Sequenzierung von SS-rDNS von Legionellen beschrieben.

Auf dem Markt ist ein Kit zum Nachweis von Legionellen in Wasserproben erhältlich. Bei einem Nachweisverfahren mit Hilfe dieses Kits wird in einem ersten Schritt ein Fragment der SS-rDNS genusspezifisch amplifiziert. In demselben Gefäß wird ein Fragment des MIP-Gens der Spezies *L. pneumophila* amplifiziert. Der Kit enthält insgesamt 7 Primer zur Durchführung einer sogenannten Multiplex-PCR unter Herstellung zweier PCR-Amplifikate. Anschließend erfolgt die Detektion der Amplifikate durch Reverse Dot Blot. Das in diesem Kit realisierte Verfahren ist wegen der Notwendigkeit des Einsatzes einer großen Anzahl von Primern komplex und in der Herstellung aufwendig. Darüber hinaus ist das bekannte Verfahren im Hinblick auf die Sensitivität unbefriedigend.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Reagenzien, die den Nachweis von Legionellen einfacher gestalten und die weniger Komponenten beinhalten. Eine weitere Aufgabe war es, spezifischere und potentiell variable Legionellen-nachweise zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist daher in einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella*, in dem mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung *Legionella* amplifiziert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Nachweisverfahren unter Verwendung des oben genannten Amplifikationsverfahrens.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist.

Kern der Erfindung ist, daß Sequenzen auf dem *Legionella*-Genom lokalisiert wurden, die das Entwerfen von Nukleinsäuresonden erlauben, die zum Nachweis aller bislang den Legionellen zugeordneten Spezies der Gattung *Legionella* verwendet werden können.

Unter Amplifikation wird die Erhöhung der Konzentration der in einem Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleinsäuren oder Teilen davon verstanden. Beispiele für solche Amplifikationsverfahren sind die Polymerase-Kettenreaktion gemäß EP-B-0 201 184, das sogenannte NASBA-Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 sowie davon abgeleitete Verfahren.

Bei dem Verfahren der EP-A-0 201 184 wird die zu amplifizierende Nukleinsäure, die einzelsträngig vorliegt oder einzelsträngig gemacht wird, mit einem molaren Überschuß zweier Oligonukleotid-Primer unter Hybridisierungsbedingungen und in Gegenwart eines induzierenden Agens für die Polymerisation und Nukleotiden behandelt, wobei die Primer so gewählt werden, daß für jeden Strang ein zum Nukleinsäurestrang komplementäres Verlängerungsprodukt des

betreffenden Primers synthetisiert wird, und daß ein Verlängerungsprodukt eines Primers, wenn es von seinem Komplement getrennt ist, als Matrize zur Synthese eines Verlängerungsprodukts des anderen Primers dienen kann, Trennen der Verlängerungsprodukte von den Matrizen, an denen sie synthetisiert wurden, und Verwendung der gebildeten Verlängerungsprodukte zur erneuten Umsetzung mit den Primern. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte ergibt sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung einer Nukleinsäuresequenz, die innerhalb der äußeren Hybridisierungspositionen der Primer liegt.

Bei dem Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 wird eine Primerkonstruktion zur Erzeugung einer doppelsträngigen Nukleinsäure verwendet, in der die zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz funktionell an einen Promotor gebunden ist. Hierzu weist einer der Primer mindestens einen Strang einer Promotorregion auf. Der intermediär gebildete Transkriptionskomplex wird Bedingungen unterworfen, unter denen unter der Kontrolle des Promotors Ribonukleinsäuren unter Verwendung der zu amplifizierenden Nukleinsäure als Matrize gebildet werden. Die gebildeten Ribonukleinsäuren werden erneut zur Bildung jeweils eines neuen transkribierbaren Nukleinsäurekomplexes verwendet. Ein Vorteil dieses Systems ist, daß es isotherm geführt werden kann.

Unter Multiplex-PCR wird ein Verfahren gemäß EP-A-0 364 255 verstanden. Nach diesem Verfahren werden in einer Eintopfreaktion durch geeignete Anordnung der Hybridisierungspositionen einer Vielzahl von Primern bestimmte Fragmente von Nukleinsäuren amplifiziert, die meist unterschiedliche Länge und Position im Genom aufweisen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press, 1986, insbesondere in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Edt. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, insbesondere 2.9.1 - 2.9.10 und Molecular Cloning, Edt. J. Sambrook et al., CSH, 1989, insbesondere 9.4.7 - 9.5.8, Bezug genommen. Dazu gehören insbesondere die bekannten Methoden zur Herstellung von markierten Nukleosidtriphosphaten, wie sie auch in EP-A-0 329 474 beschrieben sind, die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden, die Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsenzymen, die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt, sowie die Bildung von Nukleinsäuren aus Nukleosidtriphosphaten mit Hilfe von Polymerasen, gegebenenfalls unter Verwendung von sogenannten Primern.

Eine Markierung im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise radioaktiv (^{32}P), farbige oder fluoreszierende Gruppen oder Metallatome. Indirekt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie Antikörper, Antigene, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch aktive Teilterzen. Diese werden in einer nachfolgenden Reaktion oder Reaktionssequenz detektiert. Besonders bevorzugt sind Haptene, da mit ihnen markierte Nukleosidtriphosphate (rNTP oder dNTP) im allgemeinen besonders gut als Substrate von (RNS- bzw. DNS-) Polymerasen einsetzbar sind und eine anschließende Reaktion mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten oder das haptenisierte Nukleosid leicht vorgenommen werden kann. Solche Nukleosidtriphosphate sind beispielsweise Brom-Nukleosidtriphosphate oder Digoxigenin-, Digoxin- oder Fluorescein-gekoppelte Nukleosidtriphosphate. Als besonders geeignet haben sich die in EP-A-0 324 474 genannten Steroide und deren Detektion erwiesen. Für deren Inkorporation in Nukleinsäuren wird hiermit auf die EP-A-0 324 474 verwiesen.

Unter den Nukleinsäuren, die zur Verwendung des erfindungsgemäßen Amplifikations- und Nachweisverfahrens für Legionellen verwendet werden können, werden insbesondere genomische Nukleinsäuren verstanden. Genomische Nukleinsäuren enthalten unter anderem auch die Gene, welche für die ribosomale RNS (rRNS) codieren, sowie eine Reihe von Spacersequenzen. Diese werden nach der Größe der rRNS, für die sie codieren, benannt. In Legionellen-Genomen sind in dieser Reihenfolge das 16S-rRNS-Gen, das 23S-rRNS-Gen und das 5S-rRNS-Gen angeordnet. Diese Gene sind durch sogenannte Spacerregionen voneinander getrennt.

SEQ. ID. NO. 1 offenbart eine Nukleotidsequenz, die Ähnlichkeiten mit der in Spezies der Gattung Legionella enthaltenen genomischen Sequenz aufweist, die aneinander angrenzende Bereiche der 23S-rRNS, der Spacerregion zwischen 5S-rRNS- und 23S-rRNS- und des 5S-rRNS-Bereiches einschließt. Die SEQ. ID. NO. 1 schließt nur einen relativ kleinen Teil der 23S-rRNS jedoch die vollständige Spacerregion und ca. 80 % der 5S-rRNS ein.

SEQ. ID. NO. 1 stellt eine Nukleotidsequenz dar, aus welcher Teilsequenzen entnommen werden können, die gattungsspezifisch für Legionella sind.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung soll der Begriff Nukleinsäuresonde nicht im Hinblick auf die Funktion einschränkend betrachtet werden. Die oben genannten Eigenschaften sind maßgebend. Insbesondere sollen zu den Nukleinsäuresonden auch die sogenannten Probes oder Nachweissonden gezählt werden, deren Hybridisierung mit den in der Probe vorhandenen Legionellen-Nukleinsäuren als Maß für die Anwesenheit des Bakteriums nachgewiesen werden kann. Dazu kann die Nukleinsäuresonde bevorzugt weitere Teile enthalten, die den Nachweis oder die Amplifikation nicht wesentlich nachteilig beeinflussen. Zu solchen Molekülteilen gehören beispielsweise Markierungen zum Nachweis der Sonden, bzw. Hybriden, die diese Sonde enthalten, Gruppen, welche eine Immobilisierung der Nuklein-

säuresonde an eine feste Phase erlauben, feste Phasen als solche (z. B. Beads oder Oberflächen, z. B. von Reagenz- oder Detektionsgefäßen) oder weitere, nicht mit *Legionella*-Sequenzen interferierende Nukleotidsequenzen. Die Ausgestaltung der Nukleinsäuresonde richtet sich daher insbesondere nach der Art, wie der Nachweis der *Legionella*-Nukleinsäuren geführt werden soll.

Unter einer Nukleinsäuresonde wird ein Molekül mit einer festgelegten Aufeinanderfolge von Basen verstanden, welches in der Lage ist, mit natürlichen Nukleinsäuren Hybride aufgrund von Basen-Basen-Wechselwirkungen zu bilden. Hierzu gehören natürliche und künstliche Nukleinsäuren. Die künstlichen Nukleinsäuren unterscheiden sich von den natürlichen Nukleinsäuren dadurch, daß sie entweder im Basenteil (z. B. durch Verwendung von Basenanaloga, z. B. 7-Deaza-dGTP) oder im Grundgerüst (Ersatz der Zucker- oder/und Phosphateinheiten durch andere chemische Moleküte, z. B. Peptide) modifiziert sind. Derartige künstliche Nukleinsäuren sind beispielsweise auch die in WO 92/20702 beschriebenen Peptidnukleinsäuren (PNA). Wesentlich für die korrekte Funktionsweise der Nukleinsäuresonden ist die spezifische Basenpaarung, wodurch die Selektivität der Sonden erreicht wird. Besonders bevorzugt besteht eine Nukleinsäuresonde aus Desoxyribonukleinsäure (DNS).

Unter einer Nukleinsäuresonde werden auch die sogenannten Primer verstanden, welche nach Hybridisierung mit *Legionella*-Nukleinsäuren unter Verwendung eines Enzyms verlängert werden können. Typische Verlängerungsreaktionen sind beispielsweise die Anhängung von Mononukleosidtriphosphateneinheiten durch DNS-Polymerasen (z. B. *E. coli* DNS-Polymerase, Klenow-Fragment oder *Thermus aquaticus*-Polymerase) unter Verwendung der *Legionella*-Nukleinsäuren als Matrize. In diesem Fall wird mit den bislang bekannten Enzymen das 3'-Ende des Primers verlängert. Eine weitere Verlängerungsreaktion ist die Ligase-Reaktion, bei der die Nukleinsäuresonde mit einem weiteren Oligonukleotid enzymatisch verknüpft wird (z. B. EP-A-0 320 308). Zwischen der Polymerase- und der Ligasereaktion sind Mischformen bekannt (z. B. WO 90/01069).

Unter einer für *Legionella* gattungsspezifischen Nukleinsäuresonde wird eine Nukleinsäure verstanden, die mit einer Nukleinsäure hybridisiert, die eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ. ID. NO. 1 bzw. deren Komplement enthält, oder die mit allen der in Tabelle 1 genannten *Legionellenspezies* unter denselben Stringenzbedingungen hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisieren diese Nukleinsäuren mit allen möglichen Spezies der Gattung *Legionella*.

Die gattungsspezifischen Sequenzen liegen bei der Sequenz der FIG 1 bevorzugt im 23S- und/oder 5S-Bereich; wenngleich es bei geschickter Wahl der Hybridisierungsbedingungen auch möglich ist, gattungsspezifische Sonden auch im Spacer-Bereich zu entwerfen.

Tab. 1

Erwartete Amplifikationslängen 23S-5S-Spacer-Region bei Verwendung von Primerpaar B/D

Species/ Serogroup	ATCC No. (NCTC)	Stamm	Amplikonlänge/ komplette bestimmte Länge der Sequenz	EMBL Accession Number	SEQ ID. NO.
<i>L. pneumophila</i> sero 1	33152	Philadelphia-1	232bp/336bp	Z30431	26
<i>L. pneumophila</i> sero 1	33153	Knoxville-1	232bp/336bp	Z30432	27
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43108	Benidorm 030E	232bp/336bp	Z30433	28
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43112	France 5811	232bp/336bp	Z30534	29
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43109	OLDA	232bp/336bp	Z30434	30
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43110	Oxford 4032E	231bp/335bp	Z30435	31
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43113	Camperdown-1	232bp/336bp	Z30435	32
<i>L. pneumophila</i> sero 2	33154	Togus-1	232bp/336bp	Z30437	33
<i>L. pneumophila</i> sero 3	33155	Bloomington-2	232bp/336bp	Z30438	34
<i>L. pneumophila</i> sero 4	33156	Los Angeles-1	232bp/336bp	Z30439	35
<i>L. pneumophila</i> sero 4	n.a.	Portland	232bp/336bp	Z30440	36
<i>L. pneumophila</i> sero 5	33216	Dallas-1E	232bp/336bp	Z30441	37
<i>L. pneumophila</i> sero 5	(11417)	Cambridge-2	232bp/336bp	Z30442	38
<i>L. pneumophila</i> sero 6	33215	Chicago-2	232bp/336bp	Z30443	39
<i>L. pneumophila</i> sero 7	33823	Chicago-8	232bp/336bp	Z30444	40
<i>L. pneumophila</i> sero 8	35096	Concord-3	232bp/336bp	Z30445	41
<i>L. pneumophila</i> sero 9	35289	IN-23-G1-C2	232bp/336bp	Z30446	42
<i>L. pneumophila</i> sero 10	43283	Leiden-1	232bp/336bp	Z30447	43
<i>L. pneumophila</i> sero 11	43130	797-PA-H	232bp/336bp	Z30448	44
<i>L. pneumophila</i> sero 12	43290	570-CO-H	232bp/336bp	Z30449	45
<i>L. pneumophila</i> sero 13	43736	82 A 3105	232bp/336bp	Z30450	46
<i>L. pneumophila</i> sero 14	43073	1169-MN-H	232bp/336bp	Z30451	47
<i>L. anisa</i>	35292	WA-316-C3	267bp/371bp	Z30535	48
<i>L. brunensis</i>	n.a.	n.a.	246bp/350bp	Z30536	49
<i>L. cherrii</i>	35252	ORW	258bp/362bp	Z30537	50
<i>L. cincinnatiensis</i>	43753	72-OH-H	213bp/317bp	Z30452	51
<i>L. dumoffii</i>	33279	NY-23	255bp/359bp	Z30538	52
<i>L. erythra</i>	35303	SE-32A-C8	201bp/325bp	Z30453	53
<i>L. feeleii</i> sero 1	35072	WO-44C	238bp/342bp	Z30454	54
<i>L. feeleii</i> sero 2	35849	691-WI-H	238bp/342bp	Z30455	55
<i>L. israelensis</i>	43119	Bercovier-4	217bp/321bp	Z30583	56
<i>L. jordanii</i>	33623	BL-540	244bp/348bp	Z30539	57
<i>L. longbeachae</i> sero 1	33462	Long Beach-4	208bp/312bp	Z30456	58
<i>L. longbeachae</i> sero 2	33484	Tucker-1	208bp/312bp	Z30465	59
<i>L. macechermii</i>	35300	PX-1-G2-E2	250bp/352bp	Z30461	60
<i>L. micdadei</i>	33218	Tatlock	267bp/371bp	Z30460	61
<i>L. moravica</i>	n.a.	316-36	236bp/340bp	Z30457	62
<i>L. oakridgensis</i>	33761	OR-10	197bp/302bp	Z30540	63
<i>L. rubrilucens</i>	35304	WA-270A-C2	219bp/324bp	Z30458	64
<i>L. saintelensis</i>	35248	Mt St Helens-4	212bp/316bp	Z30459	65
<i>L. spiritensis</i>	35249	Mt St Helens-9	246bp/350bp	Z30464	66
<i>L. steigerwaltii</i>	35302	SC-18-C9	256bp/360bp	Z30463	67
<i>L. wadsworthii</i>	33877	81-716A	262bp/366bp	Z30462	68

Unter Spezies-spezifischen Nukleinsäuresonden werden Nukleinsäuren verstanden, die mit allen Serovaren einer Legionellenspezies unter denselben Stringenzbedingungen hybridisieren. Solche Sonden sind mit ihrer Sequenz in Beispiel 3 wiedergegeben. Darunter befindet sich auch eine *L. pneumophila*-Speziessonde, die mit allen Serovaren der Spezies *pneumophila*, nicht jedoch mit den übrigen, in Tabelle 1 genannten, Spezies aus der Gattung *Legionella* hybridisiert.

Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung sind mindestens 15 Basen lang, besonders bevorzugt zwischen 23 und 40 Basen. Es handelt sich somit um Nukleinsäuren, welche auf einfache Weise durch chemische Synthese in sogenannten (Nukleinsäure-) Synthesizern hergestellt werden können. Sequenzen, die als gattungsspezifische Sequenz für Legionella zu gebrauchen sind, erhält man durch Ausschneiden einer mindestens 15 Basen langen Sequenz aus SEQ. ID. NO. 1, wobei eine Abweichung in 1 oder 2 Basen der Gattungsspezifität in Abhängigkeit von den Hybridisierungsbedingungen in den meisten Fällen keinen Abbruch tun wird. Es ist selbstverständlich, daß die Anzahl der Abweichungen mit zunehmender Größe der Nukleinsäuresonde zunehmen kann. Erfindungsgemäß sind daher Sonden bevorzugt, die zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 sind oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 sind. Besonders bevorzugt sind Sonden, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz (in direkter Aufeinanderfolge) enthalten, die streng homolog oder streng komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist.

Die Gattungsspezifität könnte leiden, wenn die Sonde weitere Legionellaspezies-spezifische Sequenzen oder nicht-Legionella spezifische Sequenzen enthält, die eine zu spezifische bzw. zu unspezifische Hybridisierung bewirken würden. Bevorzugt sind weitere Legionella-spezifischen Sequenzen, sofern sie überhaupt vorliegen, nicht mehr als 15 Basen lang.

Desweiteren kann eine Nukleinsäuresonde im Legionella-unspezifischen Teil funktionelle Nukleotidsequenzen, wie sie beispielsweise für Promotoren oder Origins of Replication charakteristisch sind, enthalten.

Innerhalb der SEQ. ID. NO. 1 sind bestimmte Bereiche zur Auswahl von gattungsspezifischen Sequenzen insbesondere für Nachweissonden besonders bevorzugt. Besonders bevorzugte Bereiche liegen zwischen den Positionen 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 sowie 307 und 286. Besonders bevorzugt schließt die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 266 bis 296 ein.

Das erfindungsgemäße Amplifikationsverfahren kommt im Gegensatz zum Stand der Technik mit weniger als 7 Primern aus. Dies ist beispielsweise möglich dadurch, daß als Primer eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonden benutzt werden. Ein Amplifikationsverfahren, welches mit nur einem Primer auskommt, wird schon dadurch realisiert, daß der Primer mit der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert, mit Mononukleotidtriphosphaten unter Einwirkung einer DNS-Polymerase verlängert wird, das Verlängerungsprodukt von der Matrizen-Nukleinsäure getrennt und der obige Vorgang mit einem neuen Primer wiederholt wird. In jedem Zyklus wird daher pro Nukleinsäure ein Verlängerungsprodukt gebildet. Es handelt sich somit um ein lineares Amplifikationsverfahren. Exponentielle Amplifikation ist theoretisch beispielsweise dann erreichbar, wenn 2 Primer eingesetzt werden, welche die prinzipiellen Bedingungen, wie sie in der EP-A-0 201 184 beschrieben sind, erfüllen. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird ein weiteres Primerpaar eingesetzt, welches auf dem amplifizierten Nukleinsäurefragment zwischen den Hybridisierungspositionen des ersten Primerpaares hybridisiert. Diese Ausführungsform wird gelegentlich auch als "nested PCR" bezeichnet. Darin werden insgesamt 4 verschiedene Primer eingesetzt.

Auch bei den auf Transkriptionsreaktionen beruhenden Amplifikationsverfahren werden im allgemeinen Fall 2 Nukleinsäuresonden eingesetzt, die entweder auf gegenläufigen Strängen oder auf einem Strang der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert werden können.

Erfindungsgemäß handelt es sich für das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren bei allen als Primer fungierenden Nukleinsäuresonden um Legionella-gattungsspezifische Sonden. In einem besonders bevorzugten Fall hybridisiert einer der Primer mit einem Strang der Legionella-Nukleinsäure in der 23S-rDNS-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-rDNS-Region. Dadurch wird erreicht, daß das amplifizierte Teilstück der Nukleinsäuresequenz der Legionellen sowohl Teile der 23S-rDNS-Region, der 5S-rDNS-Region als auch der dazwischenliegenden Spacer-region umfaßt. Zum Verständnis muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß sich die Amplifikate unterschiedlicher Spezies in der Sequenz unterscheiden, der zwischen den einander zugewandten Enden der ursprünglichen Primer liegt. Dabei handelt es sich eben bevorzugt um Sequenzen der Spacer-Region.

Das erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikationsverfahren kann für mehrere Zwecke benutzt werden. In einer ersten Möglichkeit (z. B. im Sinne eines Screenings) kann die Summe aller in der Probe vorliegenden Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen werden. Dies ist beispielsweise möglich, wenn die in der gattungsspezifischen Amplifikation erzeugten Amplifikate mit einer weiteren gattungsspezifischen (gewünschtenfalls nachweisbar markierten) Nukleinsäuresonde zur Hybridisierung gebracht und die gebildeten Hybride nachgewiesen werden. Dabei kann die Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) so gewählt werden, daß sie in den Bereichen nahe den ursprünglichen Primerhybridisierungsstellen hybridisiert, jedoch wird die Aussagekraft des gattungsspezifischen Nachweises dadurch noch erhöht, daß die Nukleinsäuresonde in dem zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer liegenden Bereich der Amplifikate hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisiert die gattungsspezifische Nachweissonde zwischen den Positionen 242 und 299 von SEQ. ID. NO. 1 und ist zwischen 25 und 35 Nukleotiden, besonders bevorzugt 26 bis 30 Nukleotiden lang. Mit der Veränderung der Länge der Sonde muß die Hybridisierungstemperatur entsprechend angepaßt werden. Die optimale gattungsspezifische Sonde hybridisiert zwischen den Positionen 268 und 296 und ist somit 29 Nukleotide lang.

Prinzipiell sind für den Nachweis der Amplifikate alle bekannten Nachweistformate verwendbar, beispielsweise Auftrennung nach Größe der Amplifikate (z. B. Gelelektrophorese) aber auch die Blot-Verfahren. Beispielsweise kann

schon aufgrund der Größenvariabilität der Spacer-Region eine Differenzierung von Non-Pneumophila-Spezies im einfachen, hochauflösenden Agarosegel durchgeführt werden, was im Sinne eines Screeningverfahrens eine rasche orientierende Information liefert. Auf einen Nachweis, der auf einem Hybridisierungsschritt mit einer Nachweissonde beruht, kann jedoch meist nicht verzichtet werden. Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung des Reverse-Dot-Blot-Formats erwiesen. Hierzu wird beispielsweise eine gattungsspezifische Nukleinsäuresonde auf einer Membran immobilisiert und anschließend das Produkt der Amplifikationsreaktion auf die immobilisierten Sonden gegeben. Dazu müssen die Amplifikate gegebenenfalls vorher einzelsträngig gemacht werden. Wenn während der Amplifikation markierte Mononukleosidtriphosphate eingebaut wurden, ist der Nachweis der über die Nukleinsäuresonde immobilisierten Amplifikate nach Abwaschen nicht gebundener Nukleinsäuren auf einfache Weise möglich. Ein solches Format ist beispielsweise in der EP-A-0 237 362 beschrieben. Auf den Inhalt dieser Patentanmeldung wird hiermit vollinhaltlich Bezug genommen.

Ein Nachweis ist jedoch auch über die sogenannten Sandwich-Verfahren möglich, bei denen neben der immobilisierten Nukleinsäuresonde eine weitere, markierte gattungsspezifische Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) eingesetzt wird, die mit den Amplifikaten an einer anderen Position hybridisiert als die Festphasen-gebundene Sonde. Dieses Verfahren ist prinzipiell in EP-B-0 079 139 beschrieben.

Das erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikationsverfahren ermöglicht jedoch auch den verlässlichen und unkomplizierten Nachweis von Legionella-Spezies (z. B. für den klinischen Routinealltag) oder Gemischen von Spezies (z. B. eine Unterscheidung von L-pneumophila von non-pneumophila). Für diesen Fall kann im Anschluß an das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren eine Hybridisierung mit einer (gewünschtenfalls markierten) speziesspezifischen Sonde (Nachweissonde) durchgeführt werden, die im amplifizierten Bereich zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer hybridisiert. In SEQ. ID-Nos. 26 - 68 sind Sequenzen, aus welchen die speziesspezifischen Sequenzen ausgewählt werden können, für einzelne Spezies angegeben. Die speziesspezifischen Teile befinden sich insbesondere im Spacer-Bereich, der bevorzugt mittels der gattungsspezifischen Primer amplifiziert wird. Die Lage der Amplifikate (z. B. wie in Tabelle 1 angegeben) ergibt sich aus den Hybridisierungspositionen der Primer (in Tabelle 1 ist dies das Primerpaar B/D). Besonders bevorzugte speziesspezifische Nachweissonden sind in Beispiel 3.7 angegeben.

Speziesspezifische Nachweissonden, die auf diesen Spacersequenzen beruhen, sind bevorzugt länger als 15 bp und kleiner als die gesamte Spacerregion.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht daher den multiplen Nachweis von Legionella-Spezies unter Verwendung einer einzigen in einer vorgeschalteten gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion hergestellten Reaktionsmischung, die Amplifikate von Teilen der in der Probe anwesenden Legionella-Spezies enthält. Ein Vorteil der Erfindung ist daher, daß sie einen einfacheren, d. h. weniger komplexen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella ermöglicht.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist daher ein Paar von Primern zur Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren, von denen einer mit einem Strang der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure, enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-rDNS und 23S-rDNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-rDNS und 23S-rDNS, die im Genom direkt an die Spacerregion anschließen. Bevorzugt ist diese doppelsträngige Nukleinsäure höchstens 371 bp lang und ist das Produkt einer gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zum Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend mindestens eine Legionella-gattungsspezifische Nukleinsäure und mindestens eine Legionella-speziesspezifische Sonde.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

Beispiel 1:

Bakteriengewinnung und Anzucht

Die hier verwendeten Legionellen "Type strains" wurden auf gepuffertem Hefe-Kohle-Extraktagar (P.H. Edelstein, Laboratory Diagnosis of infections caused by legionellae, Eur. J. Clin. Microbiol. Vol. 6, 1, 4-10 (1987)) unter Zusatz von α -Ketoglutarat bei einer Inkubationstemperatur von 35°C in feuchter CO₂-Atmosphäre für mindestens 3 Tage angezüchtet. Gram-Färbungen, Mikroskopie und Inkubation von Blut-Agar-Platten zeigten kein Wachstum anderer Bakterien. Die Legionellen wurden mit 3 ml bidestilliertem Wassers von den Platten geerntet und verdünnt, mit 12.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Logarithmische Verdünnungsreihen und Auszählen der Kolonien auf Agarplatten ergaben durchschnittlich 10¹⁰ KBE/ml.

Beispiel 2:**DNS-Aufschluß**

Je ein 250 µl-Aliquot der jeweiligen Bakterienkultur wurde zur Freisetzung der DNS alkalisch lysiert (PCR: Clinical diagnostics and research; Springer Verlag Berlin/Heidelberg 1992, S. 79-80), indem 250 µl einer 200 mM NaOH-Lösung hinzugefügt, mit 100 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet und für 20 Minuten in einem auf 95°C vorgeheizten Thermomixer inkubiert wurden. Nach Schütteln und Zentrifugation wurden 32 µl Tris-HCl (pH 5,0) zur Neutralisierung hinzugefügt, erneut geschüttelt und zentrifugiert. Kontrollproben mit bidestilliertem Wasser wurden identisch behandelt, um mögliche Kontaminationen während der Probenaufbereitung zu erkennen.

Die so gewonnenen Nukleinsäuren konnten in den Amplifikations- und Hybridisierungs-experimenten eingesetzt werden.

Beispiel 3:**Nachweis von Legionellen (Gattung und Spezies)**

Der Nachweis von Legionellen geschah durch erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikation unter Einbau von mit Digoxigenin markiertem dUTP. Die markierten Amplifikate wurden anschließend mittels der Reverse Dot-Blot-Technik (Kawasaki et al.: Genetic analysis using polymerase chain reaction - amplified DNS and immobilized oligonucleotide probes: reverse dot-blot typing; in: Methods in Enzymology, Band 218, 1993) nachgewiesen.

1. Sonden-Herstellung (Tailing-Reaktion)

Boehringer Mannheim Terminale Transferase Kit 220-582

200 pmol Oligonukleotid

20 µl 5 x Reaktionspuffer

6 µl 25 mM CoCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM)

8 µl 10 mM dTTP (Gesamtmenge 80 nmol)

2,4 µl Terminale Transferase (60 U)

ddH₂O ad 100 µl

Gemisch eine Stunde bei 37°C inkubieren.

2. Polymerasenkettenreaktion (PCR) & Digoxigenin-Markierung der PCR-Produkte

PCR 25 µl Ansätze:

3,75 µl dNTPs (1 mM Konz)

1,25 Bohringer DIG DNS Labeling mixture

2,5 µl Perkin-Elmer Puffer I

je 0,75 µl Primer (Stammlösung 10 µM)

1 µl Taq Polymerase (Perkin-Elmer) (verdünnt 1 : 10)

H₂O ad 24 µl

1 µl DNS

Thermoprofil (Primer B & D; Perkin-Elmer 9600-Thermocycler)

95° - 3 Min.

95° - 30 Sek., 54° - 25 Sek., 72° - 30 Sek.: 30 Zyklen

72° - 5 Min.

herabkühlen auf 6°

3. Vorbereitung der Membranen

Boehringer Mannheim positively charged Nylon membranes in dünne Streifen schneiden. Mit Bleistift beschriften und mit abgeschnittener 1 ml-Pipettenspitze Kreise in die Membran "stempfen". 1 µl (2 pmol) Sonde auftragen, 10 Minuten lufttrocknen, mit 120 ml kreuzlinken (Stratalinker®, Stratagene).

Waschen der Membran (um nicht gebundene Sonde zu entfernen): (alle Streifen zusammen in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen)

Waschlösung: 5 x SSPE, 0,5 % SDS 30 Minuten bei 61°

Mit bidest. H₂O kurz waschen

lufttrocknen, Streifen können nach diesem Schritt bei -20° aufbewahrt werden.

4. Hybridisierung

Prähybridisierung - in einzelnen, nummerierten Eppis (Eppendorf-Gefäß)

- 5 Lösung (je 300ml) 5 x SSPE
0,5 % SDS
0,5 % Dextransulfat

30 Min. bei 61°.

10 Hybridisierung

PCR-Produkt wird 10 Minuten bei 95° denaturiert und zügig nach Ende der Prähybridisierung zugegeben. Genau eine Stunde bei 61° bei sanfter Rotation hybridisieren lassen.

Nach Abschluß der Hybridisierung werden die Membranen (im selben Eppendorf-Gefäß, mit jeweils 300 µl der folgenden Lösung) gewaschen:

- 15 2 x SSPE
0,1 % SDS

Waschschritte (unter leichtem Schütteln): zweimal 5 Min. bei Raumtemperatur und einmal 10 Min. bei 65°.

5. Detektion

- 20 Alle Schritte werden unter ständigem leichtem Schütteln in einem 50 ml Falcon-Röhrchen durchgeführt (Puffervolumen ca. 30 ml) (Boehringer Mannheim Katalog Nr. 117504)

a) 30 Min. D1-Puffer

b) 30 Min. D2-Puffer

- 25 c) 3 µl Antikörper-Konjugatlösung mit 30 ml frischem D2-Puffer vermischen, 30 Min. inkubieren

d) 2 x 15 Min. D1-Puffer

e) kurze Inkubierung in D3-Puffer

f) Die Membranen werden mit der DNS-Seite nach oben in einer Klarsichthülle platziert:

45 µl NBT

- 30 35 µl X-Phosphat-Lösung

10 ml D3-Puffer

g) Die Farblösung zugeben, die Membranen dabei nicht bewegen. Genau 15 Min. entwickeln.

h) Stopplösung: D4-Puffer

i) lufttrocknen

35

40

45

50

55

Puffer

20 x SSPE	3M NaCl	175,3 g NaCl
	0,2 M Na ₂ H ₂ PO ₄	27,6g Na ₂ H ₂ PO ₄
	20 mM EDTA	7,4g EDTA
	pH auf 7,4 mit NaOH einstellen, aqua bidest. ad 1.000 ml	
2 x SDS	20 g SDS	
	pH auf 7,2 mit HCl (ein paar Tropfen) einstellen, aqua bidest ad 1.000 ml	
D1	100 mM Maleinsäure	
	150 mM NaCl	
	0,3 % (w/v) Tween 20	
	pH auf 7,5 bei 20° mit NaOH einstellen	
D2	1,0 % Blocking-Reagens (Kasein, Boehringer Kit), gelöst in D1, muß ca. eine Stunde vor Gebrauch hergestellt werden bzw. kann bei -20° aufbewahrt werden.	
D3	100 mM TrisHCl	
	100 mM NaCl	
	50 mM MgCl ₂	
	pH auf 9,5 bei 20° einstellen	
D4	10 mM Tris HCl	
	1 mM EDTA	
	pH auf 8,0 einstellen	

6. PCR-Primer

18mer: 5'-GGCTGATTGCTTGACCA-3' (Primer B)	SEQ.ID.No. 2
20mer: 5'-AGGAAGCCTCACACTATCAT-3' (Primer D)	SEQ.ID.No. 3
24mer: GTTGAAGACTACGACGTTGATAGG (Primer A)	SEQ.ID.No. 4
21 mer: AATGTTTCACCTCTGAGTTCG (Primer C)	SEQ.ID.No. 5

7. Oligonucleotidsonden (5S-rDNS):

Gattungssonde:

29mer: 5'-AACCACCTGATACCTCTCGAACTCAGAA-3'	SEQ.ID.No. 6
---	--------------

L. pneumophila-Speziessonde:

31mer: 5'-ACGTGAAACGTATCGTGAAACTCTGACTC-3'	SEQ.ID.No. 7
--	--------------

L. anisa-Speziessonde:

36mer: 5'-ATGCGAATACAAGATGTAGGTTGGGC-3'	SEQ.ID.No. 8
---	--------------

L. micdadei-Speziessonde:

34mer: 5'-ATGTAAATTGCTCAGACAAATGAATACAGATT-3'	SEQ.ID.No. 9
---	--------------

L. brunensis-Speziessonde:

31mer: 5'-CCTGTTTTTACAGAGCACTTAACAATGCTCT-3'	SEQ.ID.No. 10
--	---------------

L. cherrii-Speziessonde:

29mer: 5'-AATGCAAATACAAGAAATTTAGGTTGGGC-3'	SEQ.ID.No. 11
--	---------------

L. cincinnatiensis-Speziessonde:

27mer: 5'-CTCTCTTTTACCAGGAAGTAACGCG-3'	SEQ.ID.No. 12
--	---------------

L. dumoffii-Speziessonde:

26mer: 5'-ATCAATCCTGGGGTAGGACACCTGC-3'	SEQ.ID.No. 13
--	---------------

L. erythra-Speziessonde:

24mer: 5'-AACCCGGGTAAGACCGGAAAAACC-3' SEQ.ID.No. 14
 L. feelei-Speziessonde:
 27mer: 5'-GCAAAATGAAAGACAAATGCGTTTGT-3' SEQ.ID.No. 15
 L. israelensis-Speziessonde:
 27mer: 5'-TTAAACGCTTGTAATCAAACCCATTC-3' SEQ.ID.No. 16
 L. jordanis-Speziessonde:
 27mer: 5'-TGATGAATGAATATCCCTAACATGGG-3' SEQ.ID.No. 17
 L. longbeachae-Speziessonde:
 39mer: 5'-TGCTTGATATAAGATATAACCTCTTATTACCTGAG-3' SEQ.ID.No. 18
 L. maceachernii-Speziessonde:
 32mer: 5'-GGCAATACCTTTAATAAGGCATTAATGCCTA-3' SEQ.ID.No. 19
 L. moravica-Speziessonde:
 23mer: 5'-AGGCCTTGGGCTTGTTGATTGAA-3' SEQ.ID.No. 20
 L. sainthelensi-Speziessonde:
 40mer: 5'-GTGCTGAATATAAGATATAATGTTACTCTCTTATTACC-3' SEQ.ID.No. 21
 L. spiritensis-Speziessonde:
 25mer: 5'-GTGTGCCTGAAGAAGAAACAGGGT-3' SEQ.ID.No. 22
 L. steigenwaltii-Speziessonde:
 28mer: 5'-AATGTGTATACAAGCTGTAGTTGGCCA-3' SEQ.ID.No. 23
 L. wadsworthii-Speziessonde:
 30mer: 5'-GTACGTACGAATTAGAGATTGGGTCTAGGC-3' SEQ.ID.No. 24

8. Nachweisverfahren

a) Reverse dot-blot-Hybridisierung mit 4 verschiedenen Sonden

Gemäß obigem Arbeitsprotokoll wurden Nachweisverfahren unter Verwendung des gattungsspezifischen Amplifikationsverfahrens und einer gattungs- (A) bzw. 3-speziespezifischen (B: *L. pneumophila*; C: *L. anisa*; D: *L. micdadei*) Sonden durchgeführt. In Figur 2 ist die Farbentwicklung an 10 Filtern gezeigt. Es ist klar erkennbar, daß die genus-(gattungsspezifische) Sonde (A) in jedem Falle ein Nachweissignal liefert. Die *L. pneumophila*-spezifische Sonde (B) reagiert nur mit dem Filter, der auch den Serovar 1, Philadelphia von *L. pneumophila* enthält. Mit der *L. anisa*-spezifischen Sonde (C) ist im Filter Nr. 4 ein deutliches Signal sichtbar. Die Spezies *L. micdadei* ließ sich mit der *L. micdadei*-spezifischen Sonde (D) nachweisen. *L. gormanii* konnte mit der gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden (Filter Nr. 9).

Die Belegung der Filter mit nachzuweisenden Nukleinsäuren war folgende:

- | | | |
|-----|---|---------------|
| 1: | <i>L. dumofii</i> | (2pmol probe) |
| 2: | <i>L. anisa</i> | (2pmol probe) |
| 3: | <i>L. anisa</i> | (4pmol probe) |
| 4: | <i>L. anisa</i> | (8pmol probe) |
| 5: | <i>L. micdadei</i> ATCC 33218 | (2pmol probe) |
| 6: | <i>L. micdadei</i> ATCC 33218 | (4pmol probe) |
| 7: | <i>L. micdadei</i> L 5443/90 | (2pmol probe) |
| 8: | <i>L. micdadei</i> L 5443/90 | (4pmol probe) |
| 9: | <i>L. gormanii</i> | |
| 10: | <i>L. pneumophila</i> sero 1 Philadelphia | |

Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region von *Pneumophila* und non-*Pneumophila* Spezies

In Figur 3, 4 und 5 ist das Ergebnis der Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region mit Hilfe der gattungsspezifischen Primer gemäß der vorliegenden Erfindung gezeigt. Es ist klar erkennbar, daß in jedem Fall eine Amplifikation stattfindet, wobei sich in vielen Fällen die Größe der Amplikate der einzelnen Spezies unterscheidet. Über die Größe der Amplikate ist daher eine Unterscheidung der Spezies von *Legionella* nach gattungsspezifischer Amplifikation möglich.

- | | | |
|----|---|---------|
| 1: | <i>L. pneumophila</i> sero 12 570-CO-H | (FIG 3) |
| 2: | <i>L. pneumophila</i> sero 13 | |
| 3: | <i>L. pneumophila</i> sero 14 1169-MN-H | |
| 4: | <i>L. anisa</i> WA-316-C3 | |
| 5: | <i>L. brunensis</i> | |
| 6: | <i>L. cherii</i> ORW | |

- 7: L. cincinnatiensis 72-OH-H
 8: L. dumofii NY-23
 9: L. erythra SE-32A-C8
 10: L. feeleii sero 1 WO-44C
 11: L. feeleii sero 2 691-WI-H
 12: L. israelensis Barcovier-4
 M: 100bp DNA size marker
 1: L. jordanis BL-540 (FIG 4)
 2: L. longeachae sero 1 Long Beach-4
 3: L. longbeachae sero 2 Tucker-1
 4: L. maceachernii PX-1-G2-E2
 5: L. micdadei TATLOCK
 6: L. moravica 316-36
 7: L. oakridgensis OR-10
 8: L. rubrilucens WA-270-C2
 9: L. saintelensis Mt. St. Helens-4
 10: L. spiritensis Mt. St. Helens-9
 11: L. steigerwaltii SC-18-C9
 12: L. wadsworthii 81-716A
 M: 100bp DNA size marker
 1: negative control (FIG 5)
 2: L. pneumophila sero 1 Philadelphia 1
 3: L. pneumophila sero 2 Togu-1
 4: L. pneumophila sero 3 Bloomington-2
 5: L. pneumophila sero 4 Los Angeles-1
 6: L. pneumophila sero 5 Dallas-1E
 7: L. pneumophila sero 6 Chicago-2
 8: L. pneumophila sero 7 Chicago-8
 9: L. pneumophila sero 8 Concord-3
 10: L. pneumophila sero 9 IN-23-G1-C2
 11: L. pneumophila sero 19 Leiden-1
 12: L. pneumophila sero 11 797-PA-H
 M: 100bp DNA size marker

Anstelle der in Beispiel 3 verwendeten Primer B und D können auch Primer eingesetzt werden, deren Hybridisierungspositionen auf SEQ. ID. NO. 1 abweichen. Im Folgenden sind konkrete Hybridisierungspositionen (erste Basenpaarung und Länge) von weiteren Primern angegeben. Auch bezüglich der gattungsspezifischen Sonde sind im Folgenden gleichfalls geeignete Sonden angegeben. Ebenfalls im Folgenden angegeben ist, welche Kombinationen der Primer für eine gattungsspezifische Amplifikation besonders geeignet sind.

Beispiel 4:

Variationsmöglichkeiten der Primer und Sonden

Primer

Primer B - Variationsmöglichkeiten

- 1) Pos. 104, 18mer, T_m 43,9° (Primer B aus Beispiel 3)
 2) Pos. 105, 21mer, T_m 43,0°
 3) Pos. 110, 22mer, T_m 42,8°
 4) Pos. 103, 18mer, T_m 43,9°
 5) Pos. 101, 19mer, T_m 42,7°
 6) Pos. 100, 19mer, T_m 43,5°
 7) Pos. 99, 20mer, T_m 44,2°
 8) Pos. 100, 20mer, T_m 45,0°
 9) Pos. 98, 20mer, T_m 43,5°
 10) Pos. 94, 21mer, T_m 43,1°

- 11). Pos. 104, 19mer, T_m 45,2°
 12) Pos. 105, 23mer, T_m 46,1°
 13) Pos. 113, 23mer, T_m 44,7°
 14) Pos. 102, 19mer, T_m 46,3°
 5 15) Pos. 100, 20mer, T_m 45,0°
 16) Pos. 99, 21mer, T_m 45,6°
 17) Pos. 98, 21mer, T_m 45,8°
 18) Pos. 96, 22mer, T_m 45,5°
 19) Pos. 105, 22mer, T_m 45,1°
 10 20) Pos. 109, 23mer, T_m 44,0°

Primer D - Variationsmöglichkeiten

- 21) Pos. 316, 20mer, T_m 43,7° (Primer D aus Beispiel 3)
 15 22) Pos. 312, 19mer, T_m 46,0°
 23) Pos. 317, 20mer, T_m 44,9°

Primer A:

- 20 1) Pos. 34, 21mer, T_m 44,5°
 2) Pos. 35, 22mer, T_m 45,4°
 3) Pos. 37, 21mer, T_m 44,5°
 4) Pos. 39, 20mer, T_m 44,6°
 5) Pos. 38, 29mer, T_m 42,1°
 25 6) Pos. 31, 18mer, T_m 43,1°
 7) Pos. 29, 18mer, T_m 45,9°
 8) Pos. 27, 18mer, T_m 43,2°
 9) Pos. 25, 18mer, T_m 45,4°
 30 10) Pos. 41, 19mer, T_m 43,8°

Primer C:

- 11) Pos. 286, 21mer, T_m 44,7°
 12) Pos. 286, 20mer, T_m 42,4°
 35 Variationsmöglichkeiten der 5S-Gattungssonde (nur für Primerkombination B/D)

- Pos. 268, 29mer, T_m 61,0° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)
 Pos. 269, 29mer, T_m 60,7°
 Pos. 270, 29mer, T_m 60,7°
 40 Pos. 271, 30mer, T_m 61,5°
 Pos. 267, 29mer, T_m 61,4°
 Pos. 265, 27mer, T_m 60,6°

- 23S Gattungssonde (nur für Primerkombination A/C geeignet)
 45 5'-TTGTAGTAATTGGCTGATTGTCTTGACCATA-3' SEQ.ID.No. 25

Variationsmöglichkeiten der L-pneumophila Speziessonde (nur für Primerkombination B/D und A/C geeignet)

- Pos. 162, 39mer, T_m 59,1° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)
 50 Pos. 160, 32mer, T_m 59,3°
 Pos. 163, 31mer, T_m 60,1°
 Pos. 159, 33mer, T_m 59,4°

- Die Positionsangaben (5'-terminale Base) beziehen sich auf die in FIG 1 abgebildete Sequenz, wobei Primer B und
 55 A komplementär zu den Teilen der Sequenz von FIG 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen, und Primer D und
 C sequenzidentisch zu den Teilen der Sequenz von FIG 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen und sich strom-
 abwärts (von der Sequenz in FIG 1 aus gesehen) fortsetzen.

Primerkombinationen	
Primer B/D	Primer A/C
1/21	1/11
2/21	2/11
3/21	3/11
5/21	4/11
6/21	5/12
7/21	6/12
9/21	7/11
10/21	8/12
11/22	9/11
12/22	10/11
13/22	
14/22	
15/22	
16/22	
17/22	
18/22	
11/23	
4/23	
19/23	
20/23	
8/23	
17/23	

Alle angegebenen Primer und Nukleotidsequenzen sind DNS (Oligonukleotide im Falle der Primer und Sonden) linear, einzelsträngig.

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Sonden spezifisch für *Legionella*, d. h., sie besitzen keine Wirkung als Primer bzw. Nachweissonden für Organismen, die nicht zur Gattung *Legionella* gehören. Die Primerpaare B/D und A/C wurden als nicht wirksam gegenüber *Bacillus cereus*, *Branhamella cathartalis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Cryptococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium africanum*, *avium*, *bovis*, *flavescens*, *fortuitum*, *gordanae*, *kansasii*, *terrae* and *xenopis*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *milleri*, *pneumoniae* and *viridans* and β -hemolytic *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis* and *Vibrio cholerae* charakterisiert.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
 (B) STRASSE: Sandhoferstr.116
 (C) ORT: Mannheim
 (E) LAND: DE
 (F) POSTLEITZAHL: 68305
 (G) TELEFON: 0621 759 4348
 (H) TELEFAX: 0621 759 4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Gattungs- und speziesspezifische Identifizierung von Legionellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 68

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Konsensussequenz"

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTCGAAG CCGAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTGA TACGTGAAC GTATCGTGTA	180
AACCTCGACT CTTTACCRAA CCGTGGCTT AATATAGCAA TCAAGCCTC AGGTAAACCA	240

OTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA 300
 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGCTGATTGT CTGACCA

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AGGAAGCCTC ACACATATCAT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

- (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTTGAAGACT ACGACGTTGA TAGG

24

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AATGTTTCAC TTCTGAGTTC G

21

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AACCACCTGA TACCATCTCG AACTCAGAA

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ACGTGAAACG TATCGTGTA ACTCTGACTC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella anisa

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATGCGAATAC AAGATGTAGG TTGGGC

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella micdadei

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATGTAAATTC CTCAGACAAA TGAATACAGA GTTT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCTGTTTITTA CAGAGCACTT AACATGCTC T

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella cherrii
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ARTGCRAATA CAAGAAATTT AGOTTGGGC

29

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella cincinnatiensis
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CTCTCTTTT TTACCGAAG TAACGCG

27

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella dumoffii
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATCAATACCT GGGGTAGGAC ACCTGC

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella erythra

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AACCCCGGTA AGACCGGAAA AACC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella feeleii

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GCAAAATGA AAGACAAATG CTTTCT

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella israelensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

TTAAACGCTT GTGAATCAAA CCCATTC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella jordanis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TGATGAATGA ATATCCCCTA ACATGGC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella longbeachae*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

TCCTTGATAT AAGATATAAT ACCTCTTTAT TTACCTGAG

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella maceachernii*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GGCAATACCT TAATTAAAGG CATTAATGCC TA

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella moravica*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

AGGCCTTGGG CTTGTGATT GAA

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 40 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella sainthelensis*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

GTGCTGAATA TAAGATATAA TGTTACTCTC TTTATTATCC

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella spiritensis*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

GTGTGCCCTG AAGAAGAAAC ACGGT

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 5 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella steigerwaltii
 10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

AATGCTGATA CACCTCTAG GTTGGCCA

28

- 15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 25 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella wadsworthii
 30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

GTACGTACGA ATTAGAGATT GGCCTAGGC

30

- 35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
 40 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 45 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 50 (A) ORGANISMUS: Legionella
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

55

TTGTAGTAAT TGCGTGATTG TCTTGACCAT A

31

- 5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- 10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- 15 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Philadelphia-1
- 20 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Olphila
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGTAGGCCAA	60
25	GGTGTGGGAG CGCAGTAATG CGTGAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTAACTCA GAATRTGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCGTGA	180
	AACCTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
	GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTCA	300
30	AACATTCCG CGCCAATGAT AGTGTAGGC TTCCTC	336

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:
- 35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- 40 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- 45 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Knoxville-1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: O2knox
- 50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGTAGGCCAA	60
--	---	----

55

GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATCTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTGTA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATATAGCA TCAAGCCTC AGGTAACCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Benidorm 030E
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 04ben1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATCTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTGTA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATATAGCA TCAAGCCTC AGGTAACCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: France 5811
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 05fran

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

5	GCCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGC	60
	GGTGTGGGAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGAWAC GTATCGTGT	180
	AACCTCTGACT CTTTACCAAM CCTGTGGCTT AATAWAGCAA TYAAGCCTC AGGTAAACCA	240
10	GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTA	300
	AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

15	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
	(A) LÄNGE: 336 Basenpaare
	(B) ART: Nucleotid
20	(C) STRANGFORM: Einzelstrang
	(D) TOPOLOGIE: linear
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
	(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
25	(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
	(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
	(B) STAMM: OLDA
	(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: O6olda
30	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGC	60
35	GGTGTGGGAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTACTTCA GATTATGATA TTGATTGTA TACCTGAAAC GTATCGTGT	180
	AACCTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AACAYAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA	240
	GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTA	300
40	AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

45	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
	(A) LÄNGE: 335 Basenpaare
	(B) ART: Nucleotid
	(C) STRANGFORM: Einzelstrang
50	(D) TOPOLOGIE: linear
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
	(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

55

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Oxford 4032E

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 07oxfo

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

10 GCGTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATT TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGGTGA 180
 15 AACTCTGACT CTTTACCAA CSTGTGGCTT AATAATGCAA TCAAGCCTCA GGTAAACCGAG 240
 TTTTCTGGC GACTATAGCG ATTGGAACC ACCTGATACC ATCTCGAAT CAGAAGTCAA 300
 AACATTTCCG GCCAATGATA GTGTGAGGCT TCCTC 335

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Camperdown-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 08Camp

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

40 GCGTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GATTATGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGGTGA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AACATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA 240
 45 GTTTCTCGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTTCCG GCGCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTC 335

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Togu-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 09tog

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGC	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGATAA GTATCGTGTA	180
AACCTCGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TMAAGCCTC AGGTAAMCCA	240
GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTA	300
AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Bloomington-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 10bloom

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGC	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTGTA	180
AACCTCGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAMCCA	240
GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTA	300
AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: Los Angeles-1
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 11eg4la

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

```

60 GCTCTCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNH NNCOTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAG 60
GCTGTGGAAG CGCAGTAATG COTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTATAA TTGAATTGAA TACGTACAAC GCATCGTGTA 180
AACTCCGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATACTGTAA TCAAGCCCTC AGGTAAACCA 240
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
AACATTTCOG CCCCATGAT AGTGTAGGC TTCCTC 336

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: Portland
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 12eg4po

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

```

50 GCTCTCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAG 60
GCTGTGGAAG CGCAGTAATG COTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
ATATAATCTG AGTAACCTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCGTGTA 180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TCAAGCCCTC AGGTAAACCA 240

```

GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Dallas-1E

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 13sg5da

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CCGAGTAATG YGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGCTTTGACC 120
 ATATAATCTG ACTGACTTCA GAATGTATAA TTGAATTGAA TACGTACAAC GCATCCTGTA 180
 AACTCCGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAGTGTA TCAAGCCTC AGGTAACCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Cambridge-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 14sg5cam

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60

GGGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGCTTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATATGATA TTGATTGTGA TACGTGAAC GTATCGTGA 180
 5 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATACAGCA TCAAGCCTC AGGTAACCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAA CACCTGATAC CATCTGGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

15 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

20 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Chicago-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 15q6ch

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NNCCTTGAAG ACTACGAGT TGATAGGCAA 60
 30 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGCTTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTAACTTCA GAATATGATA TTGATTGTGA TACGTGATAC GTATCGTGA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCA TCAAGCCTC AGGTAACCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAA CACCTGATAC CATCTGGAAC TCAGAAGTGA 300
 35 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Chicago-8

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 16q7

55

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

5 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CCGAGTAATG COTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTGTA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
 10 GTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAA CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTCCG CGCAATGAT AGTGTGAGGA CTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Concord-3

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 17sg8

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 35 GGTGTGGAAG CCGAGTAATG COTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTGTA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA GAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
 GTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAA CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 40 AACATTCCG CGCAATGAT AGTGTGAGGT CTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: IN-23-G1-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 18sg9

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

10 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NCCOTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GATTATGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTCTA 180
 15 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AACATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA 240
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Leiden-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 19sg10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

40 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NNCOTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTCTA 180
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AAYAYAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAACCA 240
 45 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: 797-PA-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 20sg11

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

GCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCITGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTGA TACGTGAAC GTATCGTGTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAATGCAA TCAAGCCTC AGGTAAACCA	240
GTTTCTCTGG CGMCTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA	300
AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid.

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: 570-CO-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 21sg12

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

GCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNOGHNAGA ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCITGACC	120
ATATAATCTG AGTAACCTCA GANRTGATA TTGATTGTGA TACCTGATAM GTATCGTGTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TCAAGCCTC AGGTAAACCA	240
GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA	300
AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*
 (B) STAMM: 82-A-3105
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 22sg13

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

```

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA      60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTGTA      180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAGCCTC AGGTAACCA      240
GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTGAAAC TCAGAAGTGA      300
AACATTTCCG CCGCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC                                     336

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*
 (B) STAMM: 1169-MN-H
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 23sg14

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

```

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA      60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTGTA      180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAYAGCAA TCAAGCCTC AGGTAACCA      240
GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTGAAAC TCAGAAGTGA      300

```

AACATTTCOG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC

336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 374 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella anisa
- (B) STAMM: WA-316-C2
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 24an1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

GAAGCCTCCC	TCAAGATGAG	TTTTCCCATG	AGCCCGTTG	AGACTACGA	CGTTGATAGG	60
CAAGGTGTGG	AAGCACACTA	ATGTGTGAAG	CTAACTTGTA	CTAATTGGCT	GATTGTCTTG	120
ACCATATAAT	CTGAGTTACT	TCAGATTGTG	AATGCCAATA	CAAGATGTAG	GTGGGCCAA	180
GGCTCAACCT	ACGCAGAACT	ACTTGAAACA	AAGTGTGAAC	TTCTTTAATT	ACCTAATGCT	240
TGATTGAGGT	ATAATGCCCT	ACAATCAATG	CAAAACCACT	TTTCTGTGGC	ACCATAGCGG	300
TTTGGAACCA	CCTGAATCCA	TCTGGAATCT	AGAAGTGAAA	CGAACCCGCG	CCAATGATAG	360
TGTGAGGTTT	CCTC					374

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 350 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

GCCTCCCTCA	AGATGAGTTT	TCCCATGAAG	CCCGTTGAAG	ACTACGACGT	TGATAGGCGA	60
GGTGTGGAAG	CCAGCTAATG	TGTGAAGCTA	ACTGCTACTA	ATTGGCTGAT	TGCTTGACC	120
ATATAACCTG	ATGACTTCG	GTTATGATA	GAAGATGATA	GATTATGCCG	TAAGGCACCT	180

	GTGTTAACC	TTTTTACTT	TACCAGCCTG	TTTTTACAGA	GCACTTAACA	ATGCTCTTA	240
	TCAACAGGAC	AACACTTTTC	CTGGCGACCA	TAGCGGTTG	GAACCACTG	ACTCCATCTC	300
5	GAACCTCAGTA	GTGAACAGA	CCAGCGCGA	TGATAGTGTG	AGGCTTCTC		350

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 317 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella cincinnatiensis*

(B) STAMM: 72-OH-K

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 29cin

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

	GCCTCCCTCA	AGCTGAGTTT	TCCTTGGAAG	CCGTTGAAG	ACTACGACGT	TGATAGGCAA	60
	GGTGTGGAAG	CGTAGTAATG	CGTGAAGCTA	ACTTGCTACTA	ATTGGCTGAT	TGCTTGACC	120
	ATATAATCTG	AGTTACTTCA	GAGTGAACA	GAATATAAGT	GACACCATGA	CTCTCTTAT	180
	TTACCGGAAG	TAACGCGCTC	CAAGCGCGCG	TACTCAAAC	AGTTTCTCTG	GCGACCATAG	240
	CGGTTTGAA	CCACCTGATT	CCATCTCGAA	CTCAGTAGTG	AAACGACAT	GCGCCATGA	300
	TAGTGTGAGG	TTTCCTC					317

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 359 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella dumoffii*

(B) STAMM: NY-23

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 31DUMO

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGGAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGGAAG CGCAGTAATG CGTGCAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTTACTTCA GATGAACCTA ATCAATACCT GGGGTAGGAC ACCTGCCCCG 180
 AAATAAATAC AAAATAGTGT GTCTCTTTA TTTACTCGT GCATGATTCC GGTATAATAT 240
 GCCCAATTGA TCATGTCAAA CCAAGTTTCC TGGCGACCAT AGCGGTTTGG AACCACCTGA 300
 ATCCATCTCG AACTCAGAAG TGAAACGAAC ATGCGCCAAT GATAGTGTGA GCGTCTCTC 359

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 362 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella cherril*

(B) STAMM: ORW

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 30che

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGGAAG CACAGTAATG TGTGCAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AATTACTTCA GATTAACCTA ATGCAATAC AAGAAATTTA GGTGGGCCA 180
 CGGCCCAATC TGCAAAAAA ATGTGTACTC TTTATTACG TAACGCATGA TTCCGGTATA 240
 ATCGGCCCAT TAATCATGTT AAACCAAGTT TCCTGGCGAC CATAGCGGTT TGGAACCAAC 300
 TGACTCCATC TCGAACTCAG AAGTGAAAC AACC CGGCCG CATGATAGTG TGAGGTTTCC 360
 TC 362

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 325 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella erythra*

(B) STAMM: SE-32A-C8

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 32ERY

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGGGA 60
 GGTGTGGGAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGCTTTGACT 120
 ATATAACCTG ATGCGCTTCA GGTATATGG ATAACATGAA TGTGACTCTA TTTTITACCG 180
 GCCTCGTGGC CAACCCGGGT AAGACCGGAA AARCCATGAT GCTTAAACCG TTTTCTGGC 240
 GACCATAGCA GTTTCGAACC ACCTGAATCC ATCTCGAACT CAGAACTGAA ACAGACTGCG 300
 GCCGATGATA GTGTGAGGCT TCCTC 325

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 342 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella feeleii

(B) STAMM: WO-44C

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 33feel

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGGGA 60
 GGTGTGGGAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGCTTTGACC 120
 ATATAACCTG AATTGCTTTG AGGTTATAGG CAAAAATGAA AGACAAATGC GTTTGTGTTA 180
 CCTGATAATC TTTACCGGCC TGCTGGCTGA GCACTTAAAC CTGCTTTATC CAGAACGGG 240
 AACCCTGTTT TCCTGGCGAC CATAGCGGTT TGAACACACC TGACTCCATC TCGAACTCAG 300
 AAGTGAACA AACCCTGGCC GATGATAGTG TGGACTTTCT CC 342

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 55:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 349 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella feeleii*

(B) STAMM: 691-WI-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: J4feel

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 55:

CGGGGAAGCC TCCCTCAAGA TGAGTTTTC CATGAAGCCC CTGGAAGACT ACGACGTTGA 60
 TAGGGGAGGT GTGGAAGCGC AGTAATGCGT GAAGCTAACT COTACTAATT GGCTGATTGT 120
 CTTGACCATA TAACTCGAAT TGCTTTGAGG TTATAGGCCAA AATGAAAGA CAAATGCGTT 180
 TGTGTTACCT CATATCTTT ACCGCGCTCG TGGCTGAGCA CTTAAACCTG CTTTATCCAG 240
 AACACGCAA CCGCTTTTC TGGCGACCAT AGCGGTTTG AACCACTGA CTCATCTCG 300
 AACTCAGAAG TGAACAACA CCGCGCGCAT GATAGTCTCG AGTTTCTCC 349

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 321 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella israelensis*

(B) STAMM: Bercovier-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 361sr

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 56:

GCGTCTCCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCGGTGAGG ACGACGACGT TGATAGGGA 60
 GGTGTGGAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATATCCTG AATCATTTCA GGCATGATA CAAATGAGT TTAACGCTT GTGAATCAAA 180
 CCGATTCAT CTTTACCTTC TGCCTTCAAT AAGGCAGANT AACCGTTTT CTTGGGACC 240
 ATAGCTGTTT GGTACCACT GATACCTTC CGAAGCTAGT AGTGAACAA ACACGCGTG 300
 ATGATAGTGT GGGGTCTGCC C 321

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 57:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 348 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella jordanis*

(B) STAMM: BL-540

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 38jer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 57:

```

15      GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGA      60
      GGTGTGGAAG CCGAGTAATG TGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
      ATATAACCTG AATGGCTTTT ATGTGGCAAG TCAAAGACAA GGCTTGGCAA GCTTGTGTG      180
20      CCTAATATT TATCTTTACC AGCGTGATGA ATGAATATCC CCTAACATGG GTATTGCTC      240
      AGCAGGACAA CTTTTTCTCT GCGACCATTA GCGGTTTGA ACCACCTGAC TCCATCTCGA      300
      ACTCAGAAGT GAAACGACC AGCGCGGATG ATAGTGTGAG GCTTCCTC      348

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 58:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 312 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella longbeachae* sero.1

(B) STAMM: Long Beach-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 39long1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 58:

```

45      GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGAA      60
      GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTAATA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
      ATATAATCTG AGTTACTTTA GATTATGCTT GATATAAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC      180
50      TGAGTATCAT GCCAATAATG CGCGATACTC AAAACAGTTT TCCTGGGCGAC TATAGCGGTT      240
      TGGAACCCACC TGAATCCATC TCGAACTCAG AAGTGAAACG TACATCGCGC AATGATAGTG      300
      TGAGGCTTCC TC      312

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 59:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 312 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Legionella lonbeachae* sero.2
 (B) STAMM: Tucker-1
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 40long2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 59:

```

60 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCGGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA      60
    GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
    ATATAATCTG AGTTACTCTTA GATTATGCTT GATATAAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC      180
    TGAGTATCAT GCCAATAATG CGCGATACTC AAAACAGATT TCCTGGCGAG TATAGCGGTT      240
25  TGGAACCAAC TGAATCCATC TCGAACTCAG AAGTGAAACG AACATCGCGC AATGATAGTG      300
    TGAGGCTTCC TC                                                              312

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 60:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 354 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Legionella machearchernii*
 (B) STAMM: PX-1-G2-E2
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 4lmac

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 60:

```

60 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGGTTGGAG ACTACGACGT TGATAGGCGA      60
    GGTGTGGAAG CACAGTAATG TGTGTAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
    ATATAACCTG AGCTGCTTTT AGGTGAAGA GTAAGTGATA AGGCAATACT TTAATTAAAG      180
    GCATTAAATG CTAAGCGTTT GTGTTRACCT CTAACCCCTT TACCAAGCTG ATTGGCGAAT      240

```

AGGCCAATCG GTAAACCACT TTTCTGGCG ACCATAGCGG TTTGGAACCA CTTGAATCCA 300
TCTCGAATC AGAAGTGAAA CAGACCTGCG CCAATGATAG TGTGGGGCTT CCCC 354

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 61:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

- (A) LÄNGE: 374 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20

- (A) ORGANISMUS: Legionella micdadei
- (B) STAMM: Tatlock
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 42micd

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 61:

25

GAAGCCTCCC TCAAGATGAG TTTTCCCATG AAGCCCGTTG AACACTACGA CGTGATAGG 60
CGAGGTGTGG AAGCACAGTA ATGTGTGTAG CTAACCTGTA CTAATTGGCT GATTGCTTG 120
ACCATATAAC CTGAACCTGCC TTAGGTTAT GAGTGAAGAA GCAAGGGCAAT ATTGAATGAC 180
AGGGCAATGT AAATTGCTCA GACAAATGAA TACAGAGTTT GTGTTAACCT CTATCCACTT 240
TACCAAGCTG ATTGGTTAAT AGCCCAATCG GTAAACCAGG TTTCTGGCG ACTATAGCGG 300
TTTGAACCA CTTGATCCCA TCTGAACTC AGAAGTGAAA CATACCTGCG CCAATGATAG 360
TGTGGGGCTT CCCC 374

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

40

- (A) LÄNGE: 340 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

50

- (A) ORGANISMUS: Legionella moravica
- (B) STAMM: 316-36
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 43monr

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 62:

55

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTTACTTCG GGTATAGAA GTAGACGATA AATAGAGTA GAATTCGTTA 180
 CCTCGAATCT TTACCAAGCC TTGGGCTTGT TGATGAACN CAATCATCAA TCTGAAGCTA 240
 AACAGTTTTC CTGCGGACAA TAGCGGTTG GAACCACTG ATCCCATCTC GAACCTAGAA 300
 CTGAACGAA CATCGGCCGA TGATAGTGTG AGGCTTCCTC 340

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 63:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 302 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella oakridgensis
 (B) STAMM: OR-10
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 44oak

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 63:

AGCTCCCTC GAGATGAGTT TTCCCATGAA GCCCGTTGAA GACGACGACG TTGATAGGCCG 60
 AGGTGTGGAA GCGTAGTAAT ACGTGAAGCT AACTCCTACT AATTGGCTGA TTGCTTGAC 120
 CATATAACCT GAGTTGATTC AGGTTAAGCG ATGCGTTTGT GTATGCCTCA ATCTTTACCA 180
 CTTGGAAGCG TAGCTTCCA ATACCGTTTT TCCTGGCGAC CATAGCGGTT TGGAAACCACC 240
 TGATACCATC CCGAACTCAG AAGTGAACG AACCGCGGCC AATGATAGTG TGGGGCTTCC 300
 CC 302

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 64:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 323 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella rubrilucens

(B) STAMM: WA-270A-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 45rub

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 64:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGCTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGA 60
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAACCTG ATACGCTTCA GOTTATAGCA ATAACATGAA TGTGACTCTA TTTTACC 180
 GCCTCATGGC CAGCGGTTAA CACCGTTGCC ACCATGACGC TTAACCGTT TTCCTGGCGA 240
 CCATAGCAGT CTGGAACCACT CTGAATCCAT CTCGAATCTA GAAGTGAAC AGACTCGCGC 300
 CGATGATAGT GTGAGGTTTC CTC 323

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 65:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 316 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella sainthenensis

(B) STAMM: Mt.St. Helens-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 46saint

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 65:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTGAAG CCGCTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAG CGTACTAATG CGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAACTGT AGTTACTTCA GATTGTGCTG AATATAAGAT ATAATGTTAC TCTCITTATT 180
 TACCTGAGTA TCATGCGGCT AATGACAGAT ACTCAAACA GTTTCTCTGG CGACCATAGC 240
 GGTGTGATAC CACCTGATTC CATCTCGAAC TCAGAACTCA AACGAACATG CGCCAATGAT 300
 AGGTGAGGCG TTCTTC 316

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 66:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 350 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella spiritalis

(B) STAMM: Mt. St. Helena-9

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 47spix

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 66:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTAGACGT TGATAGGCGA 60
 GCGTGGGAAG CGTACTAATG CCGGAAGCTH ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAACCTG AATGACTTCG GOTTATTGAT ACCGAAGATA GGAAGAAGAG CAAGAACGAT 180
 TGTGTTACCG AATATCTCTT TACCAGCCGT TGGTGTGCCC TGAAGAAGAA ACAGGGTTAC 240
 GACTCAGGAT AACCGTTTTT CTGGCGGATA TAGCCGTGTG GAACCACTG ATTCCATCTC 300
 GAATCAGAA GTGAACGCA CGTACGCCGA TGATAGTGTG GGGTCTCCCC 350

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 360 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella steigerwaltii

(B) STAMM: SC-18-C9

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 48steig

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 67:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTAGACGT TGATAGGCAA 60
 GCGTGGGAAG CGCAGTAATG TTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAACTCG AATTACTCA GAGTGACTGA ATGTGTATAC AAGCTGTAGG TTGGCCAAGG 180
 CACAACCTAC AGAATAAAT TTGAACCCCT TTATTACCT AATGCATGAT TGGGGTATAA 240
 TAGGCCCAAC ATCATGTAAA ACCAGTTTTT CTGGCGGACCA TAGCGGTTTG GAACCACTG 300
 ACTCCATCTC GAATCAGAA GTGAACAGA CCGCGGCCAA TGATAGTGTG AGGTTTCCTC 360

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 68:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 366 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella wadsworthii*

(B) STAMM: 81-716A

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 49wad

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 68:

```

GCCGCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA      60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
ATATAATCTG AGTTACTCTA GGTTAAGCTA TAAGTACGTA CGAATTAGAG ATTGGGTCTA      180
GGCCCAATCT AAAAAAATA AAAAAATGTG AACCTTTTTA TTACCTATA GCATGATTAG      240
GGTATAATAC GCCCAATCTA TGCGAACCA GTTTCCTGG CGACAATAGC GGCTTGGAAC      300
CACCTGATCC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA AACGAGCATG CGCCAATGAT AGTGTGAGGT      360
CTCCTC

```

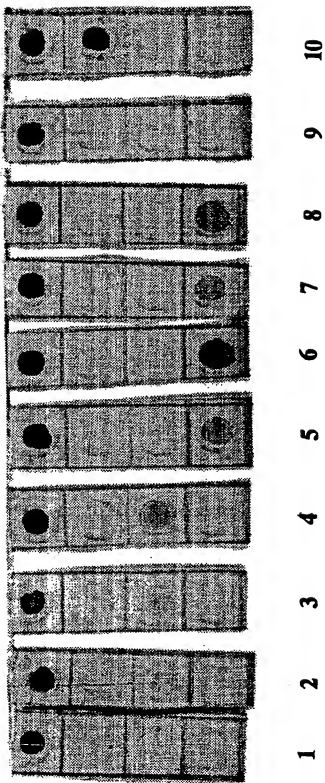
Patentansprüche

- Verfahren zur gattungsspezifischen Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella*, dadurch gekennzeichnet, daß mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung *Legionella* amplifiziert werden.
- Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* in einer Probe gekennzeichnet durch
 - gattungsspezifische Amplifikation von Nukleinsäuren aller in der Probe vorhandenen Spezies der Gattung *Legionella* unter Verwendung eines *Legionella*-gattungsspezifischen Sets von wenigstens 7 Primern und
 - Nachweis einer oder mehrerer Spezies der Gattung *Legionella* aufgrund der Amplifikate.
- Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Spezies aufgrund der unterschiedlichen Größe der Amplifikate differenziert wird.
- Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit einer gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden.
- Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe speziesspezifischer Sonden auf die Anwesenheit von *Legionella*-Spezies untersucht werden.
- Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe von *Legionella*-Untergruppen spezifischer Sonden auf die Anwesenheit von *Legionella*-Untergruppen untersucht werden.
- Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* unter gattungsspezifischer Amplifikation eines Teilstückes der Nukleinsäuresequenz der Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilstück sowohl Teile der 23S-Region und der 5S-Region, als auch die dazwischen liegende Spacerregion umfaßt.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation unter Verwendung zweier Primer durchgeführt wird, von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region hybridisiert.
- 5 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Primersequenzen Sequenzen enthalten, die ausgewählt sind aus mindestens 15 Basen langen Sequenzen, die zumindestens 90 % homolog mit oder komplementär zu Teilsequenzen der SEQ. ID. No. 1 sind.
- 10 10. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zumindestens 90 % homolog zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist, oder die zumindestens 90 % komplementär zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist.
- 15 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde keine weiteren Legionella-spezifischen Sequenzen aufweist, die mehr als 15 Basen lang sind.
- 20 12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß vor Verwendung der Nukleinsäuresonde ein Amplifikationsverfahren gemäß Anspruch 9 durchgeführt wird und die Sonde mit einem Strang des amplifizierten Teilstückes hybridisieren kann.
- 25 13. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, dadurch gekennzeichnet, daß die Summe aller möglichen Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen wird.
- 30 14. Nukleinsäuresonde zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, welche zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist, oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist.
- 35 15. Sonde gemäß Anspruch 14 dadurch gekennzeichnet, daß sie gattungsspezifisch ist.
- 40 16. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil von SEQ. ID. No. 1 zwischen den Positionen 94 und 126 oder 25 und 67 liegt.
- 45 17. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 94 und 126 oder 25 und 67 einschließt.
- 50 18. Paar von Primern zur gattungsspezifischen Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert.
- 55 19. Doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-RNS und 23S-RNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-RNS und 23S-RNS, die im Genom direkt an die Spacerregion anschließen, dadurch gekennzeichnet, daß sie höchstens 371 bp lang ist.
20. Reagenzkit zur gattungsspezifischen Amplifikation und zum speziesspezifischen Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend
 - ein gattungsspezifisches Set von weniger als 7 Primern und
 - mindestens eine Legionella-speziesspezifische Nachweis-Sonde.

Fig. 1

1: GCCTCCCTCAAGATGAGTTTTCCCATGAAGCCCGTTGAAGACTACGACGT
51: TGATAGGCAAGGTGTGGAAGCGCAGTAATGCGTGAAGCTAAGTTGTACTA
23S/Spacer
101: ATTGGCTGATTGTCTTGACCATATAATCTGAGTGACTTCAGAA/TGTGATA
151: TTGATTTGTATACGTGAAACGTATCGTGTAAGTCTGACTCTTTACCAA
Spacer/5S
201: CCTGTGGCTTAATATAGCAATCAAAGCCTCAGGTAAACCAGTT/TCCTGG
251: CGACTATAGCGAATTGGAACCACTGATACCATCTCGAACTCAGAAGTGA
301: AACATTTCCGCGCCAATGATAGTGTGAGGCTTCCTC



A
B
C
D

FIG 3

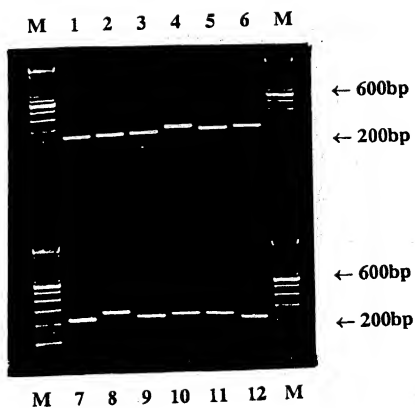


FIG 4

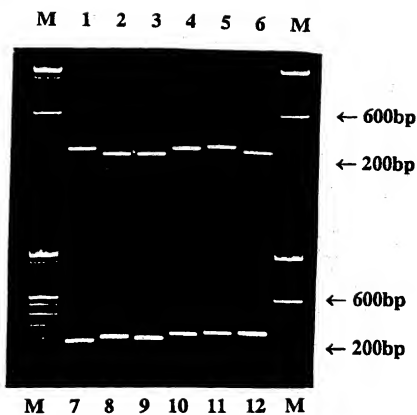
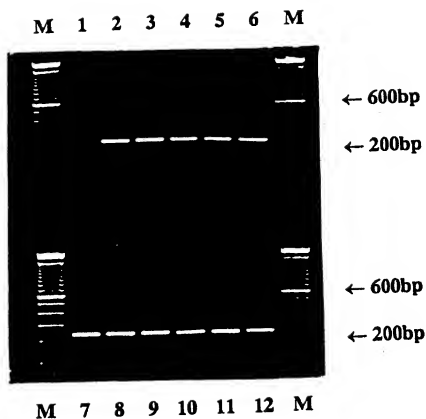


FIG 5





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 96 10 6728

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, Bd. 8, Nr. 1, Februar 1994, Seiten 11-14, XP000578308 MAIWALD M ET AL: "Characterization of contaminating DNA in Taq polymerase which occurs during amplification with a primer set for Legionella 5S ribosomal RNA"	1,2	C12Q1/68 C12P19/34 C07H21/04
Y	* das ganze Dokument *	3-20	
X	J.CLIN. MICROBIOL., Bd. 32, Nr. 6, Juni 1994, Seiten 1503-5, XP000579096 MATSUOTA-BERNARD P ET AL: "Evaluation of commercial amplification kit for detection of Legionella pneumophila in clinical specimens"	1,2	
Y	* Seite 1504, Zeile 4 - Zeile 13 *	3-20	
X	CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOL., Bd. 40, Nr. 6, Juni 1994, Seiten 495-9, XP000579148 OSHIRO R ET AL: "modification of reagents in the EnviroAmp™ kit to increase recovery of Legionella organisms in water"	1,2	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) C12Q
Y	* das ganze Dokument *	3-20	
X	J. CLIN. MICROBIOL., Bd. 31, Nr. 12, Dezember 1993, Seiten 3325-28, XP000579097 KESSLER, H. ET AL.: "Rapid detection of Legionella species in Bronchoalveolar lavage fluids with the EnviroAmp Legionella PCR amplification and detection kit"	1,2	
Y	* das ganze Dokument *	3-20	

	-/-		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Bezeichnet		Abgeschlossen der Recherche	
DEN HAAG		19. August 1996	
		Prüfer	
		Osborne, H	
KATEGORIE DER GENANNENEN DOKUMENTE			
X: von besonderer Bedeutung als Patentansprüche betrachtet		I: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	
Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie		E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	
A: technologischer Hintergrund		D: in der Anmeldung angeführter Dokument	
O: nichtchriftliche Offenbarung		L: aus anderen Gründen angeführter Dokument	
F: Zwischenliteratur		A: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EP 0 739 988 A1 (PAGES)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 96 10 6728

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	KLI. LABOR., Bd. 40, Nr. 3, 1994, Seiten 211-16, XP000579246 HEIDRICH B ET AL: "Genetische Verwandschaft innerhalb des Genus Legionella DNS Sequenzuntersuchung an ribosomalen Genen" * das ganze Dokument *	1,2	
X	EUR. J. MICROBIOL. INFECT. DIS.1, Bd. 13, Nr. 3, März 1994, Seiten 225-31, XP000579208 LISBY G ET AL: "Construction of a DNA amplification assay for the detection of Legionella species in clinical samples" * das ganze Dokument *	1,2	
Y		3-20	
Y	MED MICROBIOL LETT, Bd. 3, Nr. 6, 1994, Seiten 279-90, XP000579098 HEIDRICH B ET AL: "Automated direct sequencing of Legionella 5S rDNA" * das ganze Dokument *	3-20	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Y	WO-A-92 11273 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) * das ganze Dokument *	3-20	
A	WO-A-94 28174 (AMACO CORPORATION) * das ganze Dokument *	1-20	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Erfinder		Publi	
DEN HAAG		Osborne, H	
KATEGORIE DER GENANNEN DOKUMENTE		19. August 1996	
X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: elektronische Offenbarung P: Zweitmitteler		T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: klaren Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument A: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 100 (01/96)

EP 0 739 988

File 351:Derwent WPI 1963-2001/UD,UM &UP=200219
(c) 2002 Derwent Info Ltd

010981801

WPI Acc No: 1996-478750/ 199648

XRAM Acc No: C96-149537

Detection of Legionella bacteria - involving genus-specific nucleic acid amplification

Patent Assignee: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (BOEP); ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (HOFF)

Number of Countries: 014 Number of Patents: 005

Abstract (Basic): EP 739988 A

A method for genus-specific amplification of nucleic acids of the Legionella genus, comprising using fewer than 7 primers to amplify nucleic acids of all possible Legionella spp. is claimed. Also claimed are: (1) a method for detecting Legionella bacteria in a sample, comprising (a) genus-specific amplification of nucleic acids of all Legionella spp. in the sample using a Legionella genus-specific set of at least 7 primers, and (b) detecting one or more Legionella spp. on the basis of the amplified nucleic acids; (2) a method for detecting Legionella bacteria involving genus-specific amplification of a fragment of the nucleic acid sequence of the bacteria, where the fragment comprises parts of the 23S and 5S regions and the spacer region between them; (3) a method for detecting Legionella bacteria using a nucleic acid probe having a sequence that is at least 15 nucleotides long and is at least 90% homologous or complementary to part of the 23S or spacer region of the 336 bp sequence (I; given in the specification); (4) a method for detecting Legionella bacteria, comprising detecting the total of all possible species of the Legionella genus; (5) a nucleic acid probe for detecting Legionella bacteria which is at least 90% homologous or complementary to the 23S or spacer region of (I); (7) a pair of primers for genus-specific amplification of Legionella nucleic acids, where one hybridises with one strand in the 23S region and the other hybridises with the other strand in the 5S region of the Legionella genome; and (8) a double-stranded Legionella-specific nucleic acid which is no more than 371 bp long and comprises the spacer region between the 5S RNA and 23S RNA together with only those parts of the 5S RNA and 23S RNA that are directly adjacent to the spacer region in the genome.

USE - The method and primers are useful for the species-specific detection of Legionella.

ADVANTAGE - Fewer primers are needed than in prior art methods.

Dwg.0/5

Title Terms: DETECT; LEGIONELLA; BACTERIA; GENUS; SPECIFIC; NUCLEIC; ACID; AMPLIFY

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): C07H-021/02; C07H-021/04;

C12N-015/09; C12P-019/34; C12Q-001/04

